

---

МАТЕРИАЛЫ  
ЛЕКЦИЙ ШКОЛЫ

---

## ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ КОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМЫ ПОЗВОНОЧНЫХ: ЛЮДИ, МЫШИ, РЫБЫ...

© 2020 г. Д. А. Исаев<sup>1,\*</sup>, И. В. Володяев<sup>2,\*\*</sup>

<sup>1</sup> ВНИИ ирригационного рыбоводства Федерального научного центра животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, Московская область, Россия

<sup>2</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: dmais@hotmail.ru

\*\*e-mail: ivolodyaev@gmail.com

DOI: 10.31857/S0044452920071882

Естественным способом сохранения биологических объектов и продуктов биологического происхождения является охлаждение, вплоть до полного замораживания, приводящее к снижению скорости химических и биохимических реакций. Сохранение и восстановление жизнеспособности биологических объектов (клеток, тканей, организма в целом) после воздействия низких температур достигается за счет обратимого снижения уровня или полного прекращения метаболизма – низкотемпературного анабиоза. Такое физиологическое состояние определяется как гипотермия. Необходимость сохранения спермы животных в течение некоторого времени связана с появлением и развитием технологий искусственного оплодотворения, поскольку, во-первых, позволяет проводить искусственное осеменение отсрочено и, таким образом, планировать репродуктивные процедуры, а, во-вторых, делает возможной транспортировку генетического материала.

Документированная история научных исследований по гипотермическому хранению спермы начинается с выполненных в конце XVIII в. опытов итальянского аббата Лазаро Спалланцани по охлаждению на снегу спермы жеребца, быка и человека. Развитие и широкое применение технологий искусственной инсеминации у животных в конце XIX – начале XX в.в., в основном, благодаря работам русского ученого И.И. Иванова потребовало совершенствования методов хранения спермы в течение времени, достаточного для транспортировки или для планирования инсеминации. К началу 40-х г.г. были разработаны буферные растворы-разбавители на основе яичного желтка, позволяющие сохранять сперму сельскохозяйственных животных при температурах около +5°C в течение, как минимум, 3 сут. В 1949 г. Polge et al. сообщили об успешной криоконсервации при –79°C спермы человека. Принято считать, что эта работа положила начало широким научным исследованиям в области криобиологии и разработкам

практических подходов к криоконсервации биологических объектов. К 60-м г.г. XX в. проблема хранения спермы в животноводстве была радикально решена путем замораживания в жидком азоте на неопределенно длительное время. Вместе с тем, гипотермическое хранение спермы без замораживания не утратило актуальности, т.к. может более эффективно решать задачи, не связанные с длительным хранением материала. Значительно уступая криоконсервации по длительности, гипотермическое хранение обладает рядом преимуществ: не зависит от источника жидкого азота или сухого льда, не требует специального криологического оборудования, делает транспортировку генетического материала безопасной и удобной. Кроме того, разработка методов криоконсервации спермы различных видов животных сразу же столкнулась со множеством проблем, в числе которых видоспецифичность и зависимость от качества материала, что затрудняет стандартизацию технологий при внедрении, снижает эффективность и воспроизводимость результатов. Таким образом, наряду с разработкой методов криоконсервации спермы, поиск эффективных подходов к гипотермическому хранению не прекратился.

В 1996 г. исследователи Университета Йокогамы предложили новый способ хранения спермы при +4°C в бессолевом водном растворе глюкозы и бычьего сывороточного альбумина. Эта среда, названная EFM (англ. *electrolyte free medium*), позволяла сохранять фертильность спермы человека и мыши в течение, как минимум, 2 недель, что было существенным достижением. Несмотря на высокую эффективность и безопасность метода, эти работы не получили должного развития за рубежом.

Наши исследования подтвердили эффективность и безопасность использования бессолевой среды EFM для хранения спермы человека: после 2 недель гипотермического хранения при +4°C подвижность сохраняло более половины сперматозоидов человека, а достоверного различия между

фрагментацией ДНК до и после хранения не установлено. В период с 2010 по 2013 г.г. методика была применена в 96 программах лечения бесплодия при наличии добровольного письменного информированного согласия пациентов. Частота оплодотворения *in vitro* составила 78.0%, и 74.9% эмбрионов развились до стадии бластоцисты. В результате наступивших 26 беременностей родились 34 здоровых ребенка.

Существенным недостатком применения среды EFM является осмотический стресс, приводящий к повреждению мембран сперматозоидов. Чтобы избежать этого, мы ввели в состав раствора трегалозу в качестве “осмотического буфера”. Модифицированная среда была названа нами ISGT (*isotonic solution of glucose and trehalose*). При хранении эпидидимальных сперматозоидов лабораторных мышей (*Mus musculus*) в средах ISGT и EFM, было установлено, что трегалоза снижает относительное количество сперматозоидов с поврежденными мембранами после 14 суток хранения.

Однако первые попытки применения нами сред EFM и ISGT с осмоляльностью ~320 мосмоль/кг для гипотермического хранения спермы осетровых рыб вместо желаемого результата привели к неудаче — быстрой и необратимой утрате способности к активации. Это обусловлено особенностями строения и физиологии мужской уrogenитальной системы осетровых рыб, являющимися причиной зна-

чительно более низкой осмоляльности семенной плазмы по сравнению с плазмой крови. Учитывая эти особенности, нами было установлено эмпирически, что наилучшая сохранность спермы осетровых рыб разных видов достигается в бессолевых растворах, близких по осмоляльности к семенной плазме. В 2012–2016 г.г., нами была разработана среда ISGT-80 с осмоляльностью, сходной с семенной плазмой стерляди. Стерлядь (*Acipenser ruthenus*) была выбрана на том основании, что осмоляльность ее семенной плазмы крайне низкая даже для осетровых рыб — ~50–70 мосмоль/кг. При осеменении икры стерляди спермой, хранившейся 10 суток в ISGT-80, частота оплодотворения составила не менее 90%. Аналогичный подход был применен нами для разработки экспериментальных растворов для гипотермического хранения спермы сибирского осетра и севрюги.

Несмотря на отдельные экспериментальные достижения и прорывы, в настоящее время технологии гипотермического хранения все же не распространены широко в сельском хозяйстве и медицине. Тем не менее, успешное применение изотонических бессолевых растворов на основе глюкозы и альбумина для гипотермического хранения спермы эволюционно далеких видов позвоночных демонстрирует универсальность такого подхода, что дает надежду на продолжение этих исследований и разработок с перспективой внедрения.